

三七皂甙 Rb1 对大鼠慢性阻塞性肺疾病线粒体的保护作用

刘鹏年 李忆兰 张路 谢飞 李剑瑜 武凡

【摘要】 目的 探讨三七皂甙 Rb1 对大鼠慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 线粒体的保护作用及作用机理。**方法** 将 40 只大鼠随机分为 4 组, 分别为对照组、COPD 组、Rb1 10 mg/kg 组和 Rb1 20 mg/kg 组。用烟熏法复制 COPD 大鼠模型, 用低温差速离心法提取肺脏组织线粒体, 紫外分光光度法测定肺脏线粒体呼吸链复合体 I、II、III、IV 的活性及 ATP 合酶活性。用荧光分光光度计测量肺脏线粒体的膜电位, 采用荧光标记与荧光偏振法测定线粒体膜偏振度, 计算膜的微黏度。ELISA 法检测肺脏线粒体分泌型磷脂酶 A2 (secretory phospholipase A2, sPLA2) 的活性。**结果** COPD 组降低线粒体膜电位, 增加膜的偏振度、微黏度, 降低膜的流动性。Rb1 组显著增加呼吸链复合体 I、III、IV 的活性 ($P < 0.01$), 提高 ATP 合酶活性 ($P < 0.01$)。生物物理学证实 Rb1 组增加线粒体膜电位, 减低膜的偏振度、微黏度, 增加膜的流动性。Rb1 10 mg/kg 和 Rb1 20 mg/kg 组均抑制 sPLA2 活性的升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 三七皂甙 Rb1 通过保护大鼠肺脏线粒体结构与功能而起到防治 COPD 的作用。

【关键词】 三七皂甙 Rb1; 慢性阻塞性肺疾病; 线粒体

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.07.009

Protective effect of panax notoginseng saponins Rb1 on mitochondria of rats with chronic obstructive pulmonary disease LIU Peng-nian, LI Yi-lan, ZHANG Lu, et al. Clinical laboratory, Zhuozhou hospital, Zhuozhou 072570, china

Corresponding author: LI Yi-lan, E-mail: lpn78@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the protection mechanism of panax notoginseng saponins Rb1 on mitochondria of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** 40 rats were randomly divided into 4 groups: control group, COPD group, 10 mg/kg Rb1 group and 20 mg/kg Rb1 group. COPD rat models were established by using smoking method. Mitochondrias in rat lungs were extracted by using hypothermal differential centrifugation method, and the activity of mitochondrial respiratory complex I, II, III and IV in lungs was determined by using ultraviolet spectroscopy. Pulmonary mitochondrial membrane potential (MMP) was determined by using fluorescence spectrophotometer. Polarization degree of mitochondrial membrane and microviscosity of membrane were determined and calculate by using fluorescence tagging and fluorescence polarization methods. The activity of secretory phospholipase A2 (sPLA2) secreted by pulmonary mitochondria was tested by using ELISA. **Results** The mitochondrial membrane potential and membrane fluidity were decreased, and polarization degree and microviscosity of mitochondrial membrane were increased in rats in COPD group. The activity of mitochondrial respiratory complex I, III and IV and ATP synthase were increased significantly in rats in Rb1 group ($P < 0.01$). An increase in mitochondrial membrane potential and membrane fluidity and a decrease in polarization degree and microviscosity of mitochondrial membrane in rats of Rb1 group was proved by biophysics. 10 mg/kg and 20 mg/kg Rb1 could inhibit the sPLA2 activity ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Panax notoginseng saponins Rb1 could prevent and treat COPD through

作者单位: 072750 河北省涿州市医院检验科 (刘鹏年、张路、谢飞、武凡), 输血科 (李剑瑜), 肿瘤科 (李忆兰)

作者简介: 刘鹏年 (1978-), 本科, 主管检验师。研究方向: 临床检验。E-mail: 15932235609@163.com

通讯作者: 李忆兰 (1977-), 女, 本科, 主治医师。研究方向: 细胞的损害与抗损害。E-mail: lpn78@163.com

protective effect on pulmonary mitochondrial structure and function of rats.

【Key words】 Panax notoginseng saponins Rb1; Chronic obstructive pulmonary disease; Mitochondrial

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 以持续气流受限为特征, 是导致高致残率和高致死率的呼吸系统的慢性疾病之一, 目前尚无有效的治疗方法。三七总皂甙是五加科人参属植物三七的主要有效的活性成分, 其中以三七皂甙 Rg1、Rb1 及三七皂甙 R1 含量最高, 目前对三七皂甙 Rg1 研究较多, 但对 Rb1 知道甚少, 而且机制尚不明确^[1]。对三七皂甙 Rb1 的研究主要是探讨三七皂甙对自由基和细胞因子的影响, 对其防护 COPD 线粒体的作用机理目前鲜见报导^[2]。课题组用烟熏法复制大鼠 COPD 模型, 从组织学、生物化学、生物物理学等方面多层次地研究三七皂甙单体 Rb1 对慢性阻塞性肺疾病大鼠线粒体的作用及作用机理, 为开发三七单体 Rb1 在临床防护 COPD 的应用提供尽可能详尽的试验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

三七皂甙 Rb1 购自昆明植物研究所; 呼吸链复合体 I、II、III、IV 及 ATP 合酶试剂盒购自 R&D system 公司; 亲脂性阳离子荧光染料 Rhodamine123 购于 sigma 公司; 1,6-二苯基-1,3,5-乙三稀 (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH) 购自瑞典 Fluka 公司; 分泌型磷脂酶 A2 (secretory phospholipase A2, sPLA2) 试剂盒购自 assay kit, R&D system 公司, 采用全自动酶免分析仪测定, sPLA2 活性的测定严格按照说明书进行。

1.2 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 40 只, 体质量 (200±10) g, 动物购自河北医科大学动物试验中心, 合格证号: 冀医动字 04056。

1.3 动物模型复制

参考文献^[3]并加以改进, 将 40 只大鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, I 组 PBS 灌胃作为对照组, II 组 COPD 模型制作: 第 1 天和第 14 天向气管内滴入 LPS 各 1 g/L, 2~13 日和 15~42 日在 80 cm×50 cm×40 cm 密闭箱内香烟熏蒸 0.5 小时 (烤烟型, 焦油量 14 mg, 烟气烟碱量 1.1 mg), III 保护组在制模同时每日腹腔注射 Rb1 10 mg/kg 为 Rb1 组低剂量, IV

保护组每日腹腔注射 Rb1 20 mg/kg 为 Rb1 组高剂量组, COPD 模型组每日腹腔注射等剂量生理盐水。制模后处死各组大鼠, 提取肺脏线粒体作呼吸链复合体活性、ATP 合酶活性、线粒体膜电位、线粒体荧光偏振度及 sPLA2 活性测定。

1.4 标本采集

1.4.1 线粒体的提取 制模后处死大鼠, 迅速取出新鲜大鼠肺脏, 加入带有冰渣的分离介质中, 电动匀浆器匀浆, 制成 10% 的肺组织匀浆液, 用低温差速 600 g 离心 10 分钟, 取上清, 再以 12500 g 离心 10 分钟, 留沉淀, 此为肺脏组织线粒体。沉淀用分离介质再次悬浮, 以 12500 g 离心 10 分钟, 本次沉淀为提纯的线粒体, 沉淀加入分离介质制成线粒体悬液, 用以下各指标测定。

1.4.2 呼吸链复合体 I、II、III、IV 及 ATP 合酶的测定 用于测定呼吸链复合酶的线粒体悬液稀释成 2 mg/mL, 分装后 -70℃ 保存, 测定前反复冻融 3 次使之成为线粒体膜片段, 呼吸链复合体 I、II、III、IV 及 ATP 合酶的测定, 严格按照说明书用分光光度法测定, 呼吸链的活性单位 nmol/(min·mg) 蛋白质。ATP 合酶的活性单位为 μmolPi/(min·mg)。

1.4.3 线粒体膜电位和线粒体膜流动性的测定 参照文献^[4]提取线粒体, 以阳离子荧光染料 Rhodamine123 所引起的递质中荧光值的变化反映线粒体膜电位。用荧光分光光度计测量, 激发波长 500 nm, 发射波长 525 nm, 荧光基准值为 F1, 再加入 100 μL 线粒体, 5000 g 离心 10 分钟, 取上清测定荧光值 F2, 以 $\Delta F = (F1 - F2)$, 线粒体蛋白量 (mg) - 1 计算每 mg 线粒体蛋白引起的荧光变化。线粒体摄取 Rhodamine123 增加, 则膜电位水平增加。Rhodamine123 在活细胞内主要与线粒体结合, 线粒体受损时, 摄取 Rhodamine123 的量偏低, 膜电位下降。

线粒体膜流动性的测定: 取肺脏组织, 参照文献^[4]提取线粒体内膜, 采用荧光标记与荧光偏振法, 激发光波 362 nm, 发射光波长 432 nm, 在荧光分光光度计上 (加偏振片) 测定膜荧光偏振度 (P), 按公式 $\eta = 2p / (0.46 - P)$, 求出平均微黏度。荧光偏振度越高, 微黏度就越高, 膜的流动性越低。

1.4.4 sPLA2 活性的测定 采用全自动酶免分析仪测定, sPLA2 活性的测定严格按照说明书进行。

表 1 Rb1 对 COPD 大鼠肺脏线粒体呼吸链复合物 (I ~ V) 活性的影响

组别	复合体 I	复合体 II	复合体 III	复合体 IV	复合体 V
对照组	0.991±0.175	0.318±0.062	0.069±0.08	0.089±0.014	16.22±3.33
COPD 组	0.480±0.101	0.298±0.044	0.031±0.05	0.035±0.010	6.92±1.24
Rb1 10 mg/kg 组	0.634±0.124	0.285±0.042	0.049±0.06	0.057±0.011	13.92±2.24
Rb1 20 mg/kg 组	0.801±0.117	0.301±0.053	0.063±0.07	0.082±0.012	15.02±3.15

1.5 统计学处理

各组数据用 SPSS 16.0 统计软件分析进行数据处理, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并经正态性检验及方差齐性检验。多组间均数比较采用单因素方差分析, 方差齐时两两比较采用组间 Q 检验, 检测各资料的统计学显著性差异, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异非常显著。

2 结果

2.1 Rb1 对 COPD 大鼠肺脏线粒体呼吸链复合物 (I ~ V) 活性的影响

呼吸链 (I ~ IV) 的活性单位 $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 蛋白质。呼吸链 V 即 ATP 合酶的活性单位为 $\mu\text{mol Pi}/\text{mg}$ 。呼吸链复合体 I ~ IV 称为线粒体电子传递体。

本试验观察到与对照组相比, COPD 组大鼠肺脏线粒体呼吸链复合物 I、III、IV、V 活性显著下降 ($P < 0.01$), 分别下降 51.0%、55.3% 和 60.8%、57.3%。由表 1 可见, Rb1 10 mg/kg 治疗组和 Rb1 20 mg/kg 治疗组与 COPD 组相比有显著性差异 ($P < 0.01$)。而对于复合体 IV 的活性, Rb1 10 mg/kg 治疗组与 Rb1 20 mg/kg 治疗组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。提示: COPD 严重影响大鼠肺脏线粒体呼吸链复合物的活性, 尤其是复合体 IV 即限速酶的活性; Rb1 对大鼠肺脏线粒体膜的呼吸链复合物 I、III、IV、V 的活性有显著保护作用。

2.2 Rb1 对 COPD 大鼠肺脏线粒体膜电位和膜流动性的影响

实验结果显示: 与对照组相比, COPD 组大鼠摄取 Rhodamine 123 显著降低, 相对荧光强度低, 线粒体膜电位显著低于对照组 ($P < 0.01$), 说明线粒体膜的结构受损。COPD 组线粒体膜的偏振度增加, 膜的微黏度升高, 导致线粒体膜的流动性下降。Rb1 10mg/kg 组和 Rb1 20mg/kg 组与 COPD 组相比有明显差异 ($P < 0.01$), 提示 Rb1 对慢阻肺线粒体膜的保护作用。见表 2。

表 2 Rb1 对 COPD 大鼠肺脏线粒体膜电位和膜流动性的影响

组别	膜电位 (相对荧光强度)	膜流动性	
		P	η
对照组	650.19±58.9	0.313±0.01	1.96±0.08
COPD 组	380.89±32.2	0.545±0.02	3.81±0.11
Rb1 10mg/kg 组	492.03±52.1	0.361±0.01	2.36±0.08
Rb1 20mg/kg 组	620.22±50.1	0.343±0.01	2.13±0.07

2.3 三七皂甙 Rb1 对 COPD 大鼠肺脏线粒体 sPLA2 活性的影响

与对照组相比, COPD 组大鼠肺脏线粒体 sPLA2 于制模后迅速增高, $P < 0.01$; 与 COPD 组相比, Rb1 10mg/kg 组和 Rb1 20mg/kg 组 sPLA2 活性明显低于相应的 COPD 组, $P < 0.01$; 与 Rb1 10mg/kg 组相比, Rb1 20mg/kg 组 sPLA2 活性有显著性差异, 说明 Rb1 减低 sPLA2 活性的剂量依赖性。见表 3。

表 3 三七皂甙 Rb1 对 COPD 大鼠肺脏线粒体 sPLA2 活性的影响

组别	SPLA2 活性的测定
对照组	46.22±7.13
COPD 组	192.58±27.58
Rb1 10mg/kg 组	101.75±14.22
Rb1 20mg/kg 组	54.49±8.73

3 讨论

De-Luca 等^[4]认为 COPD 患者肺实质破坏的典型表现为小叶中央型的肺气肿, 由炎症介质引起的肺脏线粒体结构与功能的改变及细胞因子网络的紊乱被认为是肺脏线粒体结构破坏的主要机制。目前对 COPD 主要采用对症治疗, 现有的治疗方法令人堪忧。本实验详细的研究 COPD 大鼠肺脏线粒体膜复合物的结构与功能的改变、细胞因子 sPLA2 的变化, 探讨三七皂甙 Rb1 对 COPD 大鼠肺脏线粒体的防护作用及作用机理。

线粒体呼吸链的电子传递是由 5 个酶复合体构成的, 呼吸链复合体 I ~ IV 称为线粒体电子传递体, 进行电子传递和将质子跨膜到线粒体内膜外的功能。呼吸链复合体 IV 是线粒体电子传递链的末

端转移酶,是氧化磷酸化的限速酶^[5]。当质子顺此梯度经复合体 V (ATP 合酶) F₀ 部分回流时,其 F₁ 部分催化 ADP 和 P_i 生成 ATP,因此 ATP 合酶能直接反应线粒体的呼吸功能^[6]。本实验支持 Makabe^[5] 的观点,观察到 COPD 大鼠线粒体呼吸链复合物 I、III、IV、V 活性显著下降,表明 COPD 不仅对以 NADH 为底物的呼吸链起始端有影响,且对呼吸链的限速酶复合物 IV 影响尤为显著 ($P < 0.01$)。由于线粒体电子传递体功能下降,不能建立起有效的质子跨膜梯度,因此 ATP 生成减少;同时本实验观察到能直接反应线粒体呼吸功能的 ATP 合酶活性下降,进一步 ATP 生成减少,加重线粒体的损害。三七皂甙 Rb1 组与 COPD 组相比,三七皂甙 Rb1 明显增高呼吸链复合物 I、III、IV、V 复合物的活性、总 ATPase 活性, $P < 0.01$ 。本实验表明三七皂甙 Rb1 对 COPD 大鼠线粒体呼吸链复合体有显著的保护作用,有利于线粒体结构与功能的恢复。

Makabe^[5] 报道线粒体呼吸链复合物的损伤可促进线粒体膜通透性增高,离子转运功能紊乱,影响线粒体膜电位的正常维持。本实验观察到 COPD 大鼠肺脏线粒体膜电位显著下降,与对照组相比 $P < 0.01$,三七皂甙 Rb1 明显增高线粒体膜电位,提高线粒体的功能。

正常的线粒体膜流动性为膜发挥各种生理功能,呼吸链上电子传递过程和氧化磷酸化过程均依赖与呼吸链活性成分在内膜中的侧向扩散和碰撞,即膜的流动性^[7]。本实验采用荧光偏振法。实验检测到 COPD 大鼠线粒体膜流动性明显下降,其差异均有统计学意义, $P < 0.01$,提示大鼠线粒体呼吸链复合物的损伤,导致线粒体膜刚性增加,流动性下降,与李忆兰等^[8] 研究的急性 COPD 大鼠线粒体膜偏振度相比,没有明显差异,说明急性和慢性 COPD 大鼠线粒体膜的流动性均下降明显。与 COPD 组大鼠线粒体相比,三七皂甙 Rb1 10 mg/kg 组和 Rb1 20 mg/kg 组减低荧光偏振度,降低微黏度,导致膜流动性显著增加, $P < 0.01$,保护了线粒体膜,使其发挥正常的功能。

DeLuca 等^[9] 提出 sPLA2 参与肺组织炎症的产生和肺泡表面活性物质的代谢,在急慢性肺损伤中起着重要作用,有可能成为肺损伤治疗的靶点。目前有学者报道^[10] 在正常情况下,磷脂酰丝氨酸位于磷脂双分子层的内侧不易被 sPLA2 水解。当肺脏线粒体受损时,线粒体膜分子重排,磷脂酰丝氨酸暴露在胞膜外侧,而 sPLA2 水解的最适底物为磷脂

酰丝氨酸,因此 sPLA2 迅速水解磷脂酰丝氨酸产生并释放脂类介质,加重了 COPD 线粒体的损害,而线粒体损害使 sPLA2 活性进一步增高,sPLA2 在这个级联反应中处于关键位置。三七皂甙 Rb1 明显降低 sPLA2 活性并对其有明显剂量依赖性,因而降低 COPD 线粒体损伤的产生与扩散。

总之 COPD 的形成是一个综合的多因素参与的过程,sPLA2 对线粒体膜磷脂酰丝氨酸的水解造成线粒体膜的结构与功能的改变。三七皂甙 Rb1 通过降低 sPLA2 活性和脂类介质对 COPD 线粒体的损害,维持了肺脏线粒体正常膜电位,恢复膜的流动性,使呼吸链复合物活性恢复,改善了线粒体能量代谢,对 COPD 大鼠肺脏线粒体有显著的保护作用,从而起到防治 COPD 的作用。

参 考 文 献

- [1] 陆燕,潘旭.三七总皂甙中代表性皂苷含量测定方法学的建立及稳定性研究[J].中国药理学通报,2014,4(11):88-91.
- [2] 包金凤,张明文,卢新政,等.三七皂甙 Rb1、Rg1 预应对对肥厚心肌细胞缺氧复氧损伤细胞凋亡的影响[J].甘肃医药,2010,29(2):121-124.
- [3] Angelis N, Porpodis K, Zarogoulidis P, et al. Airway inflammation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Thorac Dis, 2014, 6(S1):167-172.
- [4] Maniatis NA, Sfika A, Nikitopoulou I, et al. Acid-induced acute lung injury in mice is associated with P44/42 and c-Jun N-terminal kinase activation and requires the function of tumor necrosis factor α receptor I[J]. Shock, 2012, 38(4):381-386.
- [5] Makabe H, Kojika M, Takahashi G, et al. Interleukin-18 levels reflect the long-term prognosis of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. J Anesth, 2012, 26(5):658-663.
- [6] Deshpande DA, Wang WC, Mellmoyle EL, et al. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction[J]. Nat med, 2010, 16(11):1299-1304.
- [7] Scully M, Gang C, Condon C, et al. Protective role of cyclooxygenase (COX)-2 in experimental lung injury: evidence of a lipoxin A₄-mediated effect[J]. J Surg Res, 2012, 175(1):176-184.
- [8] 李忆兰,戴富林,武凡,等.三七皂甙 Rb1 对急性呼吸衰竭大鼠的作用及作用机制的研究[J].环球中医药杂志,2015,8(2):144-148.
- [9] De-Luca D, Baroni S, Vento G, et al. Secretory phospholipase A₂ and neonatal respiratory distress: pilot study on broncho-alveolar lavage[J]. Intensive care med, 2008, 34(10):1858-1864.
- [10] 李剑瑜,刘鹏年,武凡,等.三七皂甙 Rg1 对脂多糖诱导的大鼠肝细胞损伤的防护作用[J].环球中医药杂志,2012,5(5):19-22.

(收稿日期:2015-03-07)

(本文编辑:董历华)